云 南 植 物 研 究 1993; 15 (1): 107—109
Acta Botanica Yunnanica

转 TMV-CP 基因的烟草植株中几丁酶和 β-1，3-葡聚糖酶活力的变化

杜良成 李 英 胡运乾
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

ACTIVITIES OF CHITINASE AND β-1，3-GLUCANASE IN TOBACCO PLANTS TRANSFORMED BY TMV COAT PROTEIN GENE

DU Liang-Cheng，LI Ying，HU Yun-Qian
(*Kunming Institute of Botany*，*Academia Sinica*，Kunming 650204)

关键词 烟草花叶病毒；外壳蛋白基因；几丁酶；β-1，3-葡聚糖酶
Key words TMV；Coat protein gene；Chitinase；β-1，3-Glucanase

利用交叉保护原理，将病毒外壳蛋白基因预先导入感病烟草中，使其获得对病毒感染的抵抗能力，是目前植物抗病毒遗传育种中一种较为有效的方法，已经使烟草、蕃茄等多种作物获得了对 TMV，CMV 等病毒的抗性[1，2]。我们用 T-DNA 区携有嵌合的烟草花叶病毒外壳蛋白基因和卡那霉素抗性基因（NPTⅡ）的土壤农杆菌转化了烟草，转化株中有胭脂碱（Nopaline）和外壳蛋白（CP）的表达，其中 CP 的表达量可达 100—800 ng／100μg 蛋白[3]。这表明转化的烟株中已结构性的预存了大量异体物质，这些物质的存在将如何影响植物本身的抗性系统是值得研究的。几丁酶和 β-1，3-葡聚糖酶是植物诱导抗性系统的主要成员，在植物对包括病毒、细菌、真菌在内的所有病害的抵抗中起作用[4]。本文中我们报道 TMV 接种后，转化和未转化烟草中这两种酶活力的变化，以了解异源物质的预存对烟草本身诱导抗性系统的影响。

材料和方法

材料 经叶碟片共培养的转化菌（SRI）移栽到温室中，长至大十字期时，用不同梯度浓度的 TMV 溶液进行金钢砂磨擦接种，对照以蒸馏水代替。未转化苗也进行相同处理。

酶的提取及测定 取 8—10 g 烟草叶片，于预冷的 100 mmol／L 柠檬酸钠缓冲液（含 14 mmol／L 巯基乙醇，6 mmol／L 抗坏血酸，pH6.8）提取 4 小时，约 3ml／g 鲜重，双层纱布过滤，滤液 15000× g 离心 20 分钟，上清液经适当浓缩后上样于 100 mmol／L 柠檬酸钠缓冲液平衡的 Sephadex G-25 柱，平衡缓冲液洗脱，收集蛋白部分即为粗酶提取液。几丁酶活力的测定按 Boller 等人的方法[5]。β-1，3-葡聚糖酶活力根据从还原的昆布糖中释放的还原糖量来决定[6]。酶活力均取 3 组相同处理的平均值。

蛋白质含量的测定 参照考马斯亮兰洁进行蛋白质定量[7]。

Nopaline 测定 提取液在 Whatman 3 MM 滤纸上 400 伏电泳 1.5 小时，坂口试剂显色，标准 Nopaline 及精氨酸作对照[3]。

CP 基因表达的检测 参照马德芳等人的酶标免疫测定方法[8]。

1991-08-03 收稿

结果和讨论

Nopaline 和外壳蛋白的表达测定

Nopaline 是转化植株标记基因的产物。经纸电泳后，证明供试的转化烟株中均有 Nopaline，未转化株则没有（图 1）。我们以前的研究表明，标记基因的表达并不一定与抗性基因（CP 基因）的表达同步，在标记基因表达的转化株中约有 3 .5%的植株没有抗性基因的表达[3]。因此，我们对所有供试材料进行了检测，选出有 CP 表达的转化株，并证明未转化株中无 CP 存在。

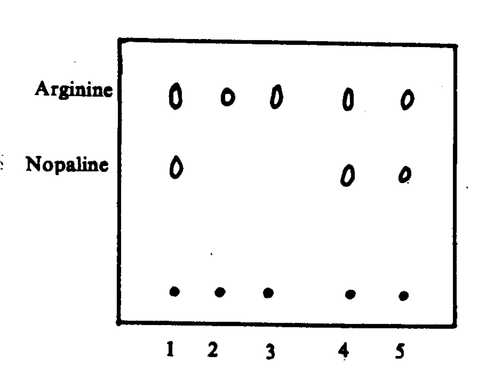


图 1 烟草中 Nopaline 的纸电泳

Fig.1 Paper electrophoresis of Nopaline in tobacco. 1. Standard Nopline and arginine. 2. & 3. Untransformed plants; 4. & 5. Transformed plants

TMV 接种后酶活力的变化

烟草感病植株一般在 TMV 接种后 7 天发病，而转化的抗性株可延迟发病 40 天以上。测定接种后 7 天内几丁酶活力的变化（图 2–A），结果表明未转化的植株中，酶活力随着时间不断增加，到第 7 天是接种前的 4 倍左右，这与许多报道相似[4]。在转化株中，接种后第 1 天酶活力就迅速上升到最高水平，以后持续下降，到第 6 天回到原来水平，第 7 天保持第 6 天的水平。这表明转化后几丁酶的诱导已不同于未转化的植株，接种 TMV 只能使酶活力有短期的提高，而不能起到持续诱导的作用。当用水代替 TMV 后，转化和未转化的烟株中几丁酶变化不大，只在第 1—2 天有弱增加，这可能是接种时用金钢砂擦伤叶片引起的反应[4]。但是，转化株中整个酶活力水平比未转化株高达一倍以上，表明即使没有病原菌感染，转化株的基础活力仍比未转化株高，从而可能有利于转化株基础抗性的提高。图 2–B 是 TMV 接种后，β–1，3–葡聚糖酶活力的变化。在转化和未转化的植株中，β–1，3–葡聚糖酶的变化很类似于几丁酶的变化，基础活力仍是转化的比未转化的高，但没有几丁酶明显。这个结果也证实了植物抗性系统中，几丁酶和 β–1，3–葡聚糖酶是被协同诱导的，即使转化后也是如此。

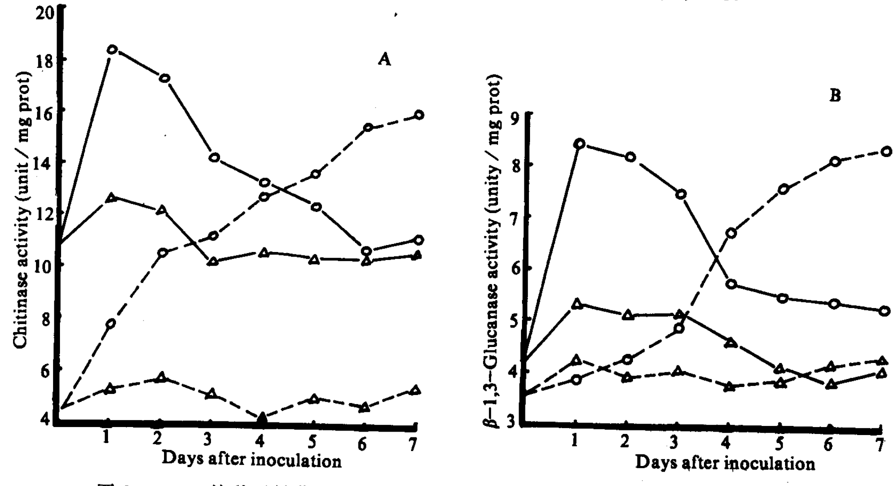


图 2 TMV 接种后转化和未转化烟株中几丁酶和 β–1，3–葡聚糖酶活力的变化

Fig. 2 Time course curve of chitinase and β–1，3–glucanase activity in TMV coat protein gene transformed plants（——）and untransformed plants（……），inoculated with TMV（o）or treated with d–H_2O（△）。

在以上结果后，转化株尽管预存了 Nopaline 及 CP 等异源物，但并没有影响其原有抗性物质的表达，而很可能提高了基础抗性。当 TMV 接种后，转化株中酶活力迅速升高，将有利于对病原菌的快速

抑制。由于抗性的转化株中 TMV 不能繁殖和扩散，因此不象感病株那样其中的酶活力被不断的诱导提高。

抗性不同的转化株中酶活力的变化

CP 基因转化的烟草对 TMV 的抗性有强有弱，强的转化株可使 TMV 接种后 2 个月不发病，弱的转化株在 TMV 接种后 10 天左右即发病，TMV 大量扩增，与未转化的感病株类似。测定抗性不同的转化株中几丁酶和 β-1，3-葡聚糖酶活力的变化，发现高抗株中酶活力只在接种后第 1 天上升，以后下降，到第 5—6 天回到基础水平，而低抗株中酶活力在接种后不断上升，到第 7 天提搞了 2—4 倍，而基础活力高抗株比低抗株高 1—3 倍（图 3）。因此，尽管都有外源基因的表达，不同抗性的转化株中酶活力的诱导并不相同，两个酶的变化只与植物对 TMV 的抗感情况有关，而不受其中外源物的影响。

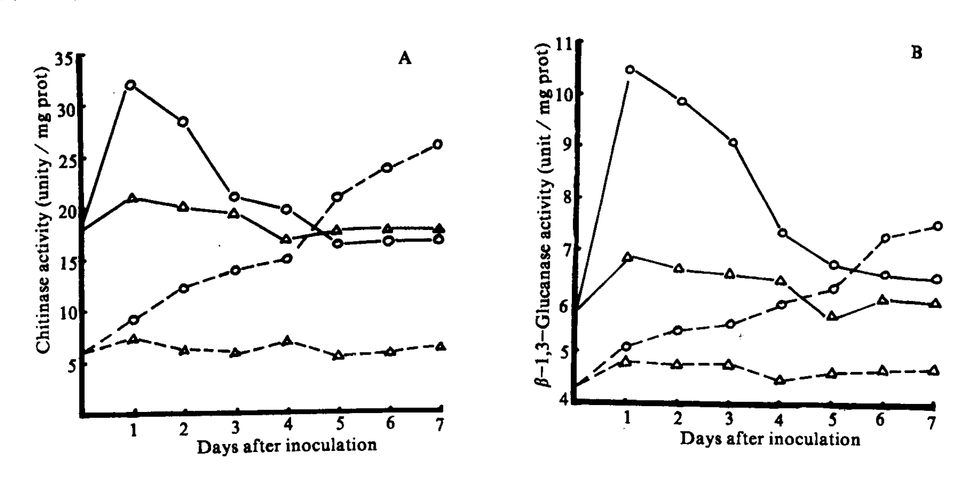


图 3　TMV 接种后不同抗性的转化株中几丁酶和 β-1，3-葡聚糖酶的活力的变化

Fig . 3　Time course curve of chitinase and β-1，3-glucanase activity in TMV coat protein gene transformed plants (——high resistance to TMV，···low resistance to TMV)，inoculated with TMV (o) or treated with d-H_2O (△)

致谢　本研究得到云南省科委经费支持。

参　考　文　献

〔1〕 王钧，胡运乾，陈莞苑．烟草花叶病毒外壳蛋白嵌合基因的重组．云南植物研究 1987; **9** (4): 455—462

〔2〕 田颖川，秦晓峰，王桂玲等．表达烟草花叶病毒外壳蛋白的转基因烟草及其对TMV的抗性．中国科学B辑 1990; **8**: 822—831

〔3〕 李英，胡运乾，陈文岗等．烟草花叶病毒外壳蛋白的基因导入和转化烟株的再生．云南植物研究 1989; **11** (3): 247—253

〔4〕 杜良成，王钧．病原相关蛋白及其在植物抗病中的作用．植物生理学通讯 1990; (4): 1—6

〔5〕 Boller T, Gehri A, Mauch F, et al. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 1983; **157**: 22—31

〔6〕 Mauch F, Hadwiger L, Boller T. Ethylene: symptom, not singal for the induction of chitinase and β-1, 3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol* 1984; **76**: 607—611

〔7〕 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantitives of protein ultilizing the principle binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248—254

〔8〕 马德芳，邱并生，田波．花椰菜花叶病毒的酶联免疫吸附分析．微生物学报 1981; **21** (1): 63—67